

アルツハイマー病動物モデルの作製とその評価法

著者	Matsuda Hiroshi, Kinuya Keiko, Tsuji Shiro, Terada Hitoshi, Shiba Kazuhiro, Kojima Kazuhiko, Mori Hirofumi, Sumiya Hisashi, Hisada Kinichi
雑誌名	核医学
巻	28
号	8
ページ	883-891
発行年	1990-08-01
URL	http://hdl.handle.net/2297/3324

アルツハイマー病動物モデルの作製とその評価法

松田 博史	絹谷 啓子	辻 志郎	寺田 一志
柴 和弘	小島 一彦	森 厚文	隅屋 寿
久田 欣一			

核医学第27巻第8号別刷

(1990年8月発行)

《ノート》

アルツハイマー病動物モデルの作製とその評価法

Preparation and Assessment of Animal Model of Alzheimer's Disease

松田 博史*¹ 絹谷 啓子*¹ 辻 志郎*² 寺田 一志*³
 柴 和弘*⁴ 小島 一彦*⁵ 森 厚文*⁴ 隅屋 寿*¹
 久田 欣一*¹

Hiroshi MATSUDA*¹, Keiko KINUYA*¹, Shiro TSUJI*², Hitoshi TERADA*³
 Kazuhiro SHIBA*⁴, Kazuhiko KOJIMA*⁵, Hirofumi MORI*⁴
 Hisashi SUMIYA*¹ and Kinichi HISADA*¹

*¹Department of Nuclear Medicine, Kanazawa University School of Medicine

*²Department of Radiology, Toyama Medical Pharmaceutical University

*³Department of Radiology, Ohashi Hospital, Toho University School of Medicine

*⁴Radioisotope Center, Kanazawa University

*⁵School of Allied Medical Professions, Kanazawa University

I. はじめに

近年の中枢神経核医学領域の発展にはめざましいものがあり、シングルフォトンで標識された新しい放射性医薬品の開発と撮像機器である single photon emission computed tomography (SPECT) 装置の普及によって、一般病院においても容易に断層像による局所脳血流情報を得ることが可能となった。現在では脳における機能的情報を提供する手段として脳血管障害に加えて、てんかん、痴呆、躁うつ病、精神分裂病などの疾患で臨床的有用性¹⁻⁴⁾ が認められており、形態学的情報を提供する X 線 CT や MRI とともに一般診療上必

須の検査となってきた。

さらに SPECT による中枢神経核医学領域では、局所脳血流以外の機能的情報をもたらすとされる神経受容体分布の画像化が欧米にて報告されはじめており⁵⁻⁹⁾、わが国でも近い将来種々の神経受容体分布の SPECT 像によって、精神・神経疾患の解明、診断、薬物治療の効果判定、および治療方針の選択が可能になるものと期待される。

一方、今後、いずれの神経受容体分布の SPECT 像の臨床的有用性の評価に先だっても、より優れた SPECT 用放射性リガンドの開発および正常動物または疾患モデルにおける基礎的研究が不可欠であると考えられる。

本研究においては、将来の神経受容体分布の SPECT 像の標的疾患として高齢化社会の到来にともなって患者数の増加が予想されるアルツハイマー病を選択し、その疾患動物モデルの一つとして報告されている¹⁰⁾ 一側性前脳基底部破壊によるコリン作動性神経支配除去手術ラットを作製し

*¹ 金沢大学医学部核医学科

*² 富山医科薬科大学医学部放射線科

*³ 東邦大学医学部大橋病院放射線科

*⁴ 金沢大学アイソトープ総合センター

*⁵ 同 医療短期大学部

受付：2 年 3 月 13 日

最終稿受付：2 年 6 月 8 日

別刷請求先：金沢市宝町 13-1 (〒920)

金沢大学医学部核医学科

松田 博史

Key words: nuclear medicine imaging, cholinergic innervation, Alzheimer's disease, animal model.

安定 (ワンショット) マルチバイブレータにより、整形された負の出力パルスとなる。この負の出力パルスは 7404 の NOT 回路により正のパルスとされた後、7400 のリセット、セット (R-S) フリップフロップ回路の一端子にはいる。フリップフロップとは、出力が“1”および“0”の2値の安定状態を持ち、外部から与えられた入力条件によって、そのどちらかの安定状態になる回路をいう。そして次の入力条件が与えられるまで、その状態 (セット状態) に維持する、1 ビットの記憶素子である。明室と暗室の間にはスライドするドアがあり、このドアを開けるとスイッチが ON になるように連動している。一方、デジタル I/O ボード (NEC, PIO-8022A) を装着したマイクロコンピュータ (NEC, PC-8801) により、入力ポートにフリップフロップからの信号とドアスイッチからの信号の両方が入ると、コンピュータのタイマーが働き出す。ラットには、明室から比較的速やかに暗室に移動する習性がある。暗室 (幅 25 cm, 高さ 20 cm, 長さ 50 cm, アクリル板に黒色スプレー塗料を塗布) の床には中間電極板と後方電極板があり、ラットが後方電極板に達すると明室におけると同様に微弱電流が生じる。先に述べたリレー (K2) ドライバーおよび単安定マルチバイブレータを介して信号がフリップフロップ回路の前回とは別端子にはいると、入力条件の違いによりセット状態になる。このフリップフロップの出力状態の変化が入力ポートからコンピュータに伝えられタイマーが停止する。それと同時に出力ポートより 5 ボルトの電圧が生じ、リレードライバーにより増幅されリレー (K1) を働かす。このリレーの作動時間は任意に設定可能であるが通常 5 秒とした。このリレー、K1 が働くと交流 800 ボルト、最高 3 mA が後方電極板および中間電極板に加わり、電撃ショックがラット両足間に与えられる。このショックによりラットは、慌てて明室側に戻ってくる。先ほど述べたタイマーは、両室間のドアを開けてから、ラットが後方電極板に到達するまでの時間となる。この時間を受動的回避反応における反応潜時 (回避潜時) という。この実験装

置により反応潜時を自動的にかつ正確に測定することが可能である。

受動的回避学習は反応の獲得と消去について検討した。モデル作製 6 日後の獲得試行では、ラットを明室に入れ 10 秒後にドアを開けた。ラットは暗室に移動し電撃ショックを受け、明室に戻ったところで取り出した。保持テストはその 36 時間後に行い、獲得試行時と同様にラットを明室におき、ラットが暗室へ移動するまでの潜時を最大 300 秒まで測定した。

組織化学的検索

受動的回避実験における保持テスト終了後、前脳基底部破壊モデルラット 13 匹においてペントバルビタール麻酔下、ラット左心室より 200 ml の 2% パラホルムアルデヒドおよび 2% グルタルアルデヒドにて頭部を灌流し、全脳摘出後、一昼夜 4% パラホルムアルデヒド中に固定した。引き続き 20% 蔗糖リン酸緩衝液中 (0.1 M, pH 7.4) に 3 日間浸漬後、厚さ 20 μ m の連続前額断面切片を作製し、一部はクレシルバイオレットによる Nissl 染色、一部は Karnovsky & Roots¹³⁾ および Tago ら¹⁴⁾ のアセチルコリンエステラーゼ染色を施行した。

コリンアセチル転移酵素 (CAT) およびアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 活性の測定

受動的回避実験とは別に、前脳基底部破壊ラット 12 匹において、モデル作製 7 日後に破壊側と非破壊側から摘出した大脳頭頂葉皮質を、CAT 測定用の 7 匹では 1.5% w/v, AChE 測定用の 5 匹では 0.2% w/v の割合で氷冷 1 ml の EDTA 溶液 (10 mM, pH 7.4) 中にて Triton X-100 (0.5% v/v) とともにポッター型ホモジナイザーで破碎した。

CAT 測定は Fonnum の方法^{14,16)} によった。すなわち 100 μ l のミニチューブに上記のホモジネート 5 μ l と、NaCl (300 mM), リン酸緩衝液 (50 mM, pH 7.4), 塩化コリン (8 mM), EDTA (20 mM, pH 7.4), フィズスチグミン (0.1 mM) を含む 15 μ l の溶液を入れた。その後、RI 標識

基質である [acetyl-1- 14 C]-Acetyl Coenzyme A (New England Nuclear, NEC 313L, 2.01 GBq (54.32 mCi)/mmol) 20 μ l (0.4 mM) を加え 37°C にて反応を開始した。反応開始15分後に塩酸ヒドロキシラミン (1 M, pH 6.5) 20 μ l を加え、氷冷することにより反応を停止させた。この反応溶液に 0.5 ml のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を加え、20 ml 容量の液体シンチレーション用バイアルに移した。このバイアルに 10 mg の Kalibor を含む 2 ml のアセトニトリルを加え、さらに、10 ml の疎水性シンチレータ (New England Nuclear, Econofluor) を加え、静かに振盪した。生成された 14 C 標識アセチルコリンはシンチレータ相に溶解するが、RI 標識基質 Acetyl Coenzyme A は水相に留まり、液体シンチレーションカウンタでは計数されない。

AChE 測定も Fonnum の方法¹⁷⁾ によった。100 μ l のミニチューブの上記のホモジネート 5 μ l を入れ、これにリン酸緩衝液 (20 mM, pH 7.2) と牛血清アルブミン (0.8 mg/ml), および RI 標識基

質である [acetyl-1- 14 C]-Acetylcholine (New England Nuclear, NEC-350-10, 2.07GBq (55.95 mCi)/mmol) を含む溶液を加えることにより 30°C にて反応を開始させた。反応開始15分後に塩酸ヒドロキシラミン (1 M, pH 6.5) 20 μ l を加え、氷冷することにより反応を停止させた。この反応溶液に 0.5 ml のリン酸緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を加え、1 ml 容量のミニチューブに移した。これに 15 mg の Kalibor を含む 0.5 ml のブチルエチルケトンを加えボルテックスミキサーにて攪拌し、さらに遠心後、上層のブチルエチルケトンを吸引し取り除いた。この過程により、未分解の RI 標識基質アセチルコリンが取り除かれる。これを、再度繰り返した後、下層のリン酸緩衝液を 20 ml 容量の液体シンチレーション用バイアルに移した。これに 10 ml の親水性シンチレータ (New England Nuclear, Aquasol II) を加え、液体シンチレータにて測定した。

なお、蛋白定量は Bradford の方法¹⁸⁾ によった。

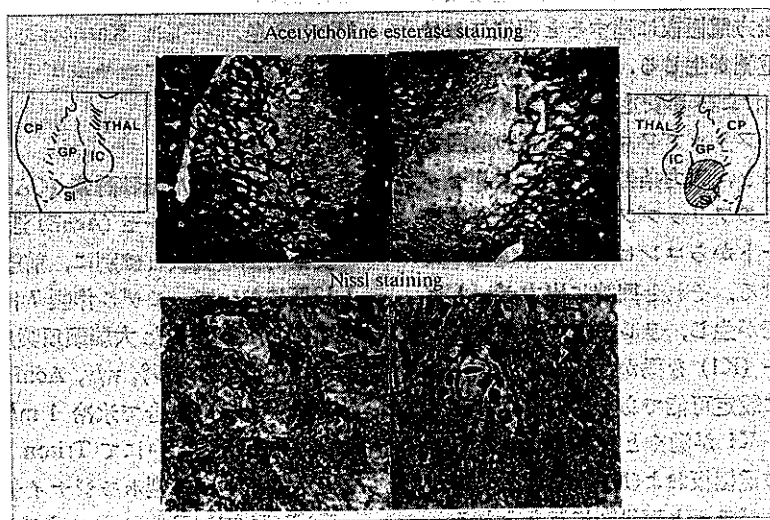


Fig. 3 Acetylcholine esterase (top row, X4) and Nissl staining (bottom row, $\times 400$) at basal forebrain in the ipsilateral (right column) and contralateral (left column) side to the unilateral lesion. These staining methods reveal neuronal cell loss, gliosis, and diminished AChE staining in a ventral region of globus pallidus, substantia innominata, and internal capsule in the ipsilateral side. CP: caudate putamen, GP: globus pallidus, IC: internal capsule, THAL: thalamus, SI: substantia innominata.

III. 結 果

受動的回避反応

獲得施行時の反応潜時は、前脳基底部破壊手術群が 8 ± 12 秒 (mean \pm SD), 偽手術群 8 ± 9 秒と差異はなく、明室から暗室へとすみやかに移動した。36時間後の保持テストでは、前脳基底部破壊

モデルにおいて13匹中5匹で著明な回避潜時の短縮がみられ (9, 15, 25, 39, 42秒), 他の8匹は300秒以上であった。一方、偽手術群9匹における保持テストでは、全例が300秒以上の回避潜時を示した。42秒以内の回避潜時を示した割合は、手術群において偽手術群よりも統計学上有意に大であった (Fischer の直接確率計算法, $p < 0.05$)。

組織化学的变化

前脳基底部破壊モデルラットにおける破壊部位では、淡蒼球腹側部、無名質、および内包において神経細胞の脱落およびグリオーシスが顕著であり、アセチルコリンエステラーゼ染色性の低下が認められた (Fig. 3)。また、投射部位である破壊側前頭葉から側頭葉・頭頂葉皮質において、アセチルコリンエステラーゼ染色性の低下が Karnovsky & Roots および Tago らのいずれの方法でもみられた (Fig. 4)。一方、帯状回皮質、後頭葉皮質、海馬、線条体の染色性には破壊側と非破壊側で差はみられなかった。

CAT および AchE 活性の変化

頭頂葉皮質において破壊側は非破壊側に比べ、CAT 活性が平均 46%、AchE 活性が平均 40%、統計学上有意に ($p < 0.001$, Student's *t*-test) 低下していた (Table 1)。

IV. 考 察

アルツハイマー病は初老期 (40-60歳) に発症し、徐々に進行する高度な痴呆を主体とする大脳の代表的変性疾患¹⁹⁾である。わが国のアルツハイマー病の有病率は欧米に比較して少ないものの、加齢にともない有病率が増加するため高齢化社会を将来迎えるわが国で患者実数の増加は必至²⁰⁾であり、積極的原因の究明と有効な治療法、早期発見方法の確立の必要性が叫ばれるている。

この疾患の死後脳においてはコリン作動性起始核とされる Meynert 核での細胞脱落と神経原線維変化が著しく^{21,22)}、大脳皮質の老人斑の出現と Meynert 核の細胞脱落量に相関があることが指摘

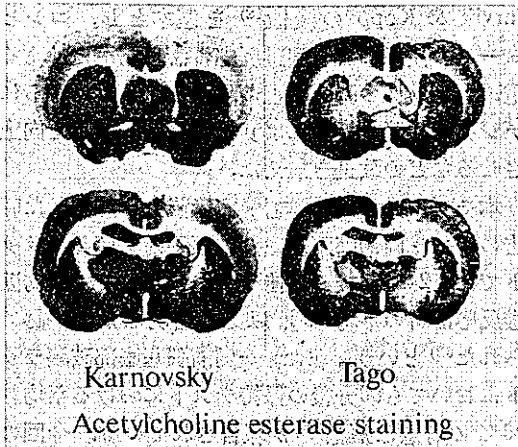


Fig. 4 Acetylcholine esterase staining by Karnovsky & Roots' and Tago's methods in coronal brain slices showing diminished staining in the extensive area of frontal, temporal, and parietal cortices in the ipsilateral side to the basal forebrain lesion. Top row: caudate putamen level. Bottom row: thalamic level.

Table 1 Effects of ibotenic acid injection into unilateral basal forebrain on CAT and AchE in parietal cortex

Enzyme	No rats	Levels in parietal cortex		% change
		Ipsilateral	Contralateral	
Choline acetyltransferase (CAT)	7	$15.1 \pm 3.2^*$	27.8 ± 2.8	-46%
nmol/mg protein/hr				
Acetylcholine esterase (AchE)	5	$1.2 \pm 0.2^*$	2.0 ± 0.2	-40%
μ mol/mg protein/hr				

* $p < 0.001$, ipsilateral side v.s. contralateral side to basal forebrain lesion in operated rats (Student's *t* test).

されている^{23,24)}。1974年にムスカリン受容体阻害作用を持つ中枢性抗コリン剤の健常者への投与によってアルツハイマー病類似の記憶・認知障害がおき、抗コリンエステラーゼ剤投与によって回復することが Drachman と Leavitt²⁵⁾ によって明らかにされて以来、コリン作動性神経の記憶・認知機能への関与が注目されてきた。これらの知見に基づいて、アルツハイマー病の動物モデルの確立とモデルによる薬物効果の評価を中心とする実験が行われてきた¹⁰⁾。

現在用いられているモデル動物の作製の方法は大きく2つに分類され、基底核の物理的および化学的破壊を起こす方法²⁶⁻²⁸⁾と、ムスカリン性アセチルコリン受容体拮抗薬(アトロピン、スコポラミンなど)の投与²⁹⁻³¹⁾による方法があり、各々について組織学的、神経化学的解析と行動薬理的評価の両面から研究が進められている。今品の実験に使用したイボテン酸は、神経繊維を除いて細胞体と樹状突起を選択的に破壊する作用をもつ³²⁾とされており、カイニン酸と比較してより均一で特異的な作用を有している。

Smith はコリン作動性神経支配除去によるアルツハイマー病の動物モデルの報告の総括¹⁰⁾において、同疾患患者と動物モデルの多項目の比較を行っている。前脳基底部破壊手術動物では、CAT, AchE, アセチルコリン、高親和性コリン取り込み等のコリン作動性ニューロンマーカーの低下、グルコース代謝のびまん性の低下、スコポラミン高感受性、学習・記憶の獲得・保持の低下、空間認識力の低下がみられ、アルツハイマー病患者における所見と一致する。一方、手術動物で認められる慢性期における学習能力の自然回復と AchE 阻害剤による学習能力の改善が患者でみとめられない、同患者でみられる非コリン作動性ニューロンマーカーの多彩な変化と特徴的な分布を示すグルコース代謝の低下が手術動物ではみられないなどの相違があったという。

本研究ではこのようなアルツハイマー病患者と動物モデルの相違点に留意しながらコリン作動性神経の核医学的画像化のための基礎的検討として

イボテン酸による一側性前脳基底部破壊手術ラットを作製し、動物モデルの妥当性の評価と核医学的画像化のための基礎的研究を行った。

学習・記憶障害の評価法には受動的および能動的回避学習や空間迷路学習など種々のものがあるが、本研究では簡便・安価で比較的短時間で結果の得られる受動的回避学習による評価を選択し、その実験装置を考案、制作した。今回の装置は Jarvik & Kopp の装置¹²⁾を基本とし、コンピュータの使用により回避反応の潜伏測定と加える電撃ショックの時間調整の誤差を減らし、さらにデジタル回路の採用により精度、計算速度を向上させるなどの改良を加えた。

本モデルにおいて学習・記憶能力を評価した報告の中で、両側前脳基底部破壊手術を施したラットでは、24時間後の保持テストにおいて受動的回避反応潜時の平均 65% 以上の著明な短縮が認められた³³⁾という。また、一側前脳基底部破壊ラットにおいても30分後の保持テストにおける平均約 20% の有意な短縮³⁴⁾が報告されている。今回の検討でも36時間後の保持テストにおいて偽手術群と比較して統計学上有意味な反応潜時の短縮が手術群ラットで認められた。Fine ら³⁵⁾はイボテン酸による一側性前脳基底部破壊ラットを作製し、受動的回避反応において記憶の獲得と保持に障害がみられたことを確認した。その後、コリン作動性神経の移植の学習能力改善への影響を調べ、記憶の獲得は移植後も改善しなかったが、記憶の保持は改善したとしている。これらのことから、主に記憶保持能力の低下が手術群ラットの受動的回避学習における反応潜時の短縮に関与したことが示唆される。

アセチルコリンは、はじめて証明された神経伝達物質であるがアセチルコリンの脳内分布そのものを可視化する適当な手段はいまだ開発されておらず、前脳基底部の破壊によるコリン作動性神経投射路を介した影響の解析のため今回は AchE 染色を施行した。この染色では酵素組織化学法が最も頻繁に用いられ、その中でも Karnovsky & Roots の方法¹³⁾が良く知られている。しかし、

この方法は AchE の強い活性が神経軸索や終末部にみられるのに対し、神経細胞体の活性は低い、または強く密に染まった線維網に妨げられて細胞体の観察・同定が困難であるという欠点を有する。このため今回は Tago らの方法¹⁴⁾ によっても検討した。この方法では、コリン神経細胞体と神経線維の両方を良好なコントラストで認識しようという長所を有する。この両法の AchE 染色において、前脳基底部破壊同側、大脳前頭頂側頭葉皮質における広い範囲の染色能の明かな低下が認められた。horseradish peroxidase (HRP) などを大脳皮質の各領野へ限局性に注入し、標識された細胞を観察するという逆行性軸索輸送法を用いた報告³⁶⁻³⁸⁾ によれば、無名質を中心とする前脳基底部におけるコリン神経の起始細胞は、ほぼ皮質の投射領域に対応した一定の部位に特異的な配列を示すという。すなわち、より吻内側のブローカの対角帯核からは帯状回および後頭葉皮質へ、無名質からは前頭葉皮質へ、淡蒼球の腹側からは頭頂側頭葉皮質へと主として投射する。今回イボテン酸を用いて破壊した部位は淡蒼球腹側部、無名質であり、この配列に合致した AchE 染色能の低下が大脳皮質で認められた。

ラット脳内のコリン作動系は内在型神経細胞と投射系に分けられる。前者には線条体におけるコリン作動系神経細胞および大脳皮質に存性するコリン作動系神経細胞がある。後者には前述のごとくラット前脳において前脳基底部に神経細胞を有し大脳皮質へ投射する前脳基底部一皮質系と、中隔およびブローカの対角帯に神経細胞を有し海馬へ投射する中隔一海馬系³⁹⁾ がある。大脳皮質におけるコリン作動系神経細胞はその 30% が内在型、残りの 70% が投射型である⁴⁰⁾ とされている。今回の実験ではこのコリン系の起始部の一つである前脳基底部を破壊し、大脳頭頂葉皮質における CAT および AchE の変化も定量した。非破壊側の頭頂葉皮質において CAT および AchE 活性の値は従来の報告値^{40,41)} とほぼ一致した。また破壊側においては非破壊側に比べ CAT 活性が平均 46%、AchE 活性が平均 40% 低下しており同手

術施行ラットにおける活性低下率の報告値^{40,41)} とほぼ同等であった。

本研究で用いた手術ラットは前述のごとく大脳皮質への投射核である前脳基底部を神経毒であるイボテン酸により化学的に破壊したものである。以上に述べたごとくこの破壊の効果を行動薬理的、および組織学・神経化学的の両面から検索したところ、学習能力の劣化と前シナプス性のコリン作動性ニューロンマーカーの著明な低下が確認された。これらのことからこのコリン作動性神経支配除去モデルは人工的なアルツハイマー病の一モデルとしては是認しうと考えられた。

V. 結 語

脳におけるコリン作動性神経支配の核医学的画像化のための基礎的研究として、イボテン酸を用いた一側前脳基底部破壊によるコリン作動性神経支配除去ラットを作成し、学習・記憶障害の評価、組織化学的検索、酵素化学的検索を行い、疾患モデルとしての妥当性を検討した。

1) より精度の高い step-through 型受動的回避実験装置を制作し、受動的回避学習における反応の獲得と消去について検討した。獲得施行時の反応潜時は、手術群と偽手術群で差異はなかったが、保持テストでは手術群は偽手術群よりも統計学上有意に短い回避潜時を示した。

2) ラット手術群の連続冠状断面切片を作製し、Nissl 染色および AchE 染色を施行した。破壊側では Nissl 染色において淡蒼球腹側部、無名質、および内包の神経細胞脱落とグリオーシスが顕著であり、AchE 染色性の低下がみられた。投射部位の破壊側前頭葉から頭頂葉、側頭葉皮質においても AchE 染色性の低下がみられた。

3) Fonnum の方法により CAT および AchE 活性の測定を行った。頭頂葉皮質において破壊側は非破壊側に比べ CAT 活性が平均 46%、および AchE 活性が平均 40% 統計学上有意に低下していた。

以上、コリン作動性神経支配除去ラットは実験的アルツハイマー病の一動物モデルとしては是認し

うと考えられた。

謝辞：本研究にあたり組織化学的検索に関しご指導いただいた金沢大学医学部第三解剖学教室、尾小山重雄先生に深く感謝致します。

文 献

- 1) Podreka I, Suess E, Goldenberg G, et al: Initial experience with technetium-99m HM-PAO brain SPECT. *J Nucl Med* 28: 1657-1666, 1987
- 2) Hill TC, Magistretti PL, Holman BL, et al: Assessment of regional cerebral blood flow (rCBF) in stroke using SPECT and N-isopropyl-(I-123)-p-iodoamphetamine (IMP). *Stroke* 15: 40-45, 1984
- 3) Fazekas F, Alavi A, Chawluk JB, et al: Comparison of CT, MR, and PET in Alzheimer's dementia and normal aging. *J Nucl Med* 30: 1607-1615, 1989
- 4) Matsuda H, Gyobu T, Hisada K, et al: SPECT imaging of auditory hallucination using ¹²³I-IMP. *Advances in Functional Neuroimaging* 2 (4): 9-16, 1989
- 5) Kung HF, Pan S, Kung MP, et al: In vitro and in vivo evaluation of [¹²³I] IBZM: a potential CNS D-2 dopamine receptor imaging agent. *J Nucl Med* 30: 88-92, 1989
- 6) Crawley JCW, Crow TJ, Johnstone EC: Uptake of ⁷⁷Br-spiperone in the striata of schizophrenic patients and controls. *Nucl Med Commun* 7: 599-607, 1986
- 7) Holman BL, Gibson RE, Hill TC, et al: Muscarinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *JAMA* 254: 3063-3066, 1985
- 8) Holl K, Deisenhammer E, Dauth J, et al: Imaging benzodiazepine receptors in the human brain by single photon emission computed tomography (SPECT). *Nucl Med Biol* 16: 759-763, 1989
- 9) Bartenstein P, Ludolph A, Schober O, et al: Comparison of blood flow and distribution of benzodiazepine receptors in focal epilepsy: preliminary results of a SPECT study. *Nucl Med* 28: 181-186, 1989
- 10) Smith G: Animal models of Alzheimer's disease: experimental cholinergic denervation. *Brain Res Rev* 13: 103-118, 1988
- 11) Paxinos G, Watson C: The rat brain in stereotaxic coordinates. 1st ed. Academic Press, Sydney, 1982
- 12) Jarvik ME, Kopp R: An improved one-trial, passive avoidance learning situation. *Psychol Rev* 21: 221-224, 1967
- 13) Karnovsky MJ, Roots L: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12: 219-221, 1964
- 14) Tago H, Kimura H, Maeda T: Visualization of detailed acetylcholinesterase fiber and neuron staining in rat brain by a sensitive histochemical procedure. *J Histochem Cytochem* 4: 1431-1438, 1986
- 15) Fonnum F: A radiochemical method for the estimation of choline acetyltransferase. *Biochem J* 100: 479-484, 1966
- 16) Fonnum F: A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J Neurochem* 24: 407-409, 1975
- 17) Fonnum F: Radiochemical microassays for the determination of choline acetyltransferase and acetylcholine esterase activities. *Biochem J* 115: 465-472, 1969
- 18) Bradford M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- 19) 池田久男: Alzheimer 病, Alzheimer 型老年痴呆. *Geriatr Med* 23: 799-806, 1986
- 20) 笠原洋男: 日本における Alzheimer 病の疫学と今後の展望. *日本臨床* 46: 10-17, 1988
- 21) Saper C, German D, White C: Neuronal pathology in the nucleus basalis and associated cell groups in senile dementia of Alzheimer type: possible role in cell loss. *Neurology* 35: 1089-1095, 1985
- 22) Whitehouse P, Price D, Struble R, et al: Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 215: 1237-1239, 1983
- 23) 水谷智彦: アルツハイマー病の神経生化学. *総合臨床* 35: 2891-2897, 1986
- 24) Arendt T, Bigl V, Tennstedt A, et al: Neuronal loss in different parts of the nucleus basalis is related to neuritic plaque formation in cortical target areas in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 20: 1-14, 1985
- 25) Drachman DA, Leavitt J: Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* 30: 113-121, 1974
- 26) Flicker C, Dean R, Watkins S, et al: Behavioral and neurochemical effects following neurotoxic lesions of a major cholinergic input to the cerebral cortex. *Pharmacol Biochem Behav* 18: 973-981, 1983
- 27) Helper D, Olton D, Wenk G, et al: Lesions in nucleus basalis and medial septal area of rats produce qualitatively similar memory impairments. *J Neurosci* 5: 866-873, 1985
- 28) Lo Conte G, Bartolini L, Casamenti F, et al: Lesions of cholinergic forebrain nuclei: changes in avoidance behavior and scopolamine actions. *Pharmacol Biochem Behav* 17: 933-937, 1982
- 29) Bartus R: Evidence for direct cholinergic involve-

- ment in the scopolamine-induced amnesia in monkeys: effects of concurrent administration of physostigmine and methylphenidate with scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav* 9: 833-836, 1978
- 30) Buresova O, Bolthius J, Bures J: Differential effects of cholinergic blockade on performance of rats in the water tank navigation task and in a radial arm maze. *Behav Neurosci* 100: 476-482, 1986
- 31) Wirsching B, Benninger R, Jhamandas K, et al: Differential effects of scopolamine on working and reference memory of rats in the radial maze. *Pharmacol Biochem Behav* 20: 659-662, 1984
- 32) Schwarcz R, Hokfelt T, Fuxe K, et al: Ibotenic acid-induced neuronal degeneration: a morphological and neurochemical study. *Exp Brain Res* 37: 199-216, 1979
- 33) Lerer B, Nicholson V: A longitudinal examination of the behavioral and biochemical deficits produced by ibotenate lesions of the rat nucleus basalis magnocellularis. *Soc Neurosci Abstr* 16: 553, 1986
- 34) Miyamoto M, Shintani M, Nagaoka A, et al: Lesioning of the rat basal forebrain leads memory impairments in passive and active avoidance tasks. *Brain Res* 328: 97-104, 1985
- 35) Fine A, Dunnett SB, Bjorklund A, et al: Cholinergic ventral forebrain grafts into the neocortex improve passive avoidance memory in a rat model of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5227-5230, 1985
- 36) Lamour Y, Dutar P, Jobert A: Topographic organization of basal forebrain neurons projecting to the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 34: 117-122, 1982
- 37) Saper CB: Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus. *J Comp Neurol* 222: 313-342, 1984
- 38) Bigl V, Woolf NJ, Butcher LL: Cholinergic projections from the basal forebrain to frontal, parietal, temporal, occipital, and cingulate cortices: a combined fluorescent tracer and acetylcholinesterase analysis. *Brain Res Bull* 8: 727-749, 1982
- 39) McIlwain H, Bachelard HS: *Biochemistry and the central nervous system*. 5th ed. Churchill Livingstone, New York, pp 413-440, 1985
- 40) Johnston MV, McKinney M, Coyle JT: Neocortical cholinergic innervation: a description of extrinsic and intrinsic components in the rat. *Exp Brain Res* 43: 159-172, 1981
- 41) Johnston MV, McKinney M, Coyle JT: Evidence for a cholinergic projection to neocortex from neurons in basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5392-5396, 1979